



PCT/FR2004/003336

REC'D 11 MAR 2005
WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

27 DEC. 2004

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine Planche'.

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1. a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03

BR1

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 e IV / 210502

REMISSION DES PIÈCES Réseauté à l'INPI DATE 31 DEC 2003 LIEU 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <i>31.12.03</i>		NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 36 rue de St Pétersbourg 75008 PARIS
Vos références pour ce dossier <i>(facultatif) BLOcp1422/1FR</i>		
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° _____ Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) ANTICORPS ANTI-INHIBITEUR DE L'URACILE-ADN-GLYCOSYLASE ET LEURS APPLICATIONS POUR LA DECONTAMINATION DES REACTIONS D'AMPLIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES.		
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		KABERTEK
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Domicile ou siège	Rue	59 Boulevard du Général Martial Valin
	Code postal et ville	75015 PARIS
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)
Adresse électronique (facultatif)		
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		

Remplir impérativement la 2^{me} page

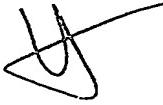
**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES	Réserve à l'INPI
DATE	1 DEC 2005
LEU	75 INPI PARIS 34 5P
N° D'ENREGISTREMENT	0315625
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		DB 540 W / 210502
Nom		ORES
Prénom		Béatrice
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36 rue de St Pétersbourg
	Code postal et ville	17 510 018 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		
01.53.21.11.00.		
N° de télécopie (facultatif)		
01.53.21.08.88.		
Adresse électronique (facultatif)		
ores@cabinet-ores.com		
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques
		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI
Le Mandataire,		
Béatrice ORES (n° 92-4046)		

La présente invention est relative à des anticorps dirigés contre l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase, et à leurs applications pour la décontamination des réactions d'amplification des acides nucléiques.

Les méthodes d'amplification des acides nucléiques comme la 5 réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont couramment utilisées dans de nombreux domaines, pour la détection d'acides nucléiques dans des échantillons d'origine diverse ou la préparation d'acides nucléiques. Toutefois, du fait de la sensibilité de ces méthodes qui permettent d'amplifier des quantités infimes d'acide nucléique cible, les réactions d'amplifications sont susceptibles d'être contaminées par 10 de l'acide nucléique généré au cours de précédentes réactions d'amplification, présent dans les réactifs, le matériel ou l'environnement de travail. Cet acide nucléique contaminant, qui est amplifié au cours des réactions de PCR ultérieures, est à l'origine de résultats faussement positifs.

Afin d'inactiver cet acide nucléique contaminant, il a été proposé 15 d'incorporer dans les séquences amplifiées, des nucléotides désoxyuridine triphosphate (dUTP) à la place des nucléotides désoxythymidine triphosphate (dTTP). L'ADN contaminant, qui contient de la désoxyuridine, est ensuite éliminé spécifiquement par l'enzyme uracile-ADN-glycosylase (UDG pour *Uracil-DNA-Glycosylase* ou UNG pour *Uracil-N-Glycosylase*) qui clive le résidu uracile, générant ainsi des sites 20 apyrimidiques qui bloquent l'amplification de l'ADN contaminant. De manière plus précise, préalablement à la réaction d'amplification, l'échantillon est traité par l'UDG de façon à éliminer l'ADN contaminant, puis l'UDG est ensuite inactivée par la chaleur, de façon à éviter la destruction de l'ADN nouvellement amplifié (Brevet américain US5418149 au nom de HOFFMANN-LA ROCHE INC ; Brevet américain 25 US5035996 et Brevets européens EP0401037 et EP0415755, au nom de LIFE TECHNOLOGIES INC).

Toutefois, il a été montré que le traitement par la chaleur induit une inactivation partielle de l'UDG qui conduit à la destruction des molécules d'ADN nouvellement synthétisées. En effet, l'UDG est inactivée au cours de la réaction 30 d'amplification qui est effectuée à des températures élevées mais une activité uracile-ADN-glycosylase, suffisante pour dégrader l'ADN nouvellement amplifié, est détectée

à la fin de la réaction d'amplification, lorsque les échantillons sont placés à température ambiante ou à une température inférieure (environ + 4°C à + 25°C).

Pour inhiber l'activité UDG résiduelle présente à la fin de la réaction PCR, il a été proposé d'utiliser, soit une UDG thermolabile (Demande Internationale PCT WO9201814 au nom de CETUS CORPORATION), soit un inhibiteur de l'UDG (Ugi pour *Uracil-DNA-glycosylase inhibitor* ; Thornton et al., Biotechniques, 1992, 13:180-184, Brevet américain US5536649 au nom de BECTON, DICKINSON AND COMPANY).

Toutefois, l'utilisation de l'Ugi est lourde à mettre en œuvre dans la mesure où l'addition de cet inhibiteur, soit à la fin de l'étape de décontamination par l'UDG, soit à la fin de la réaction d'amplification, implique des manipulations supplémentaires des dispositifs (tubes, plaques) contenant les mélanges réactionnels.

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de mettre au point une méthode de décontamination des réactions d'amplification des acides nucléiques qui soit efficace et simple à mettre en œuvre et qui réponde ainsi mieux aux besoins de la pratique que les procédés de l'Art antérieur.

Les Inventeurs ont préparé des anticorps anti-Ugi et ils ont montré que l'utilisation de complexes Ugi/anticorps anti-Ugi, à la place de l'Ugi, permettait avantageusement de réaliser la décontamination et l'amplification de l'ADN, sans manipulation supplémentaire ; le mélange réactionnel de départ contenant outre l'échantillon contenant les acides nucléiques à amplifier, et les réactifs indispensables à l'amplification de ces acides nucléiques, l'UDG et l'Ugi inactivé, sous forme de complexes réversibles Ugi/anticorps anti-Ugi.

En conséquence, la présente invention a pour objet un anticorps ou un fragment fonctionnel d'un anticorps comprenant au moins les domaines variables des chaînes lourdes et légères, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à l'inhibiteur de l'uracil-ADN-glycosylase (Ugi) de séquence GENBANK P14739 et en ce qu'il inhibe la liaison entre l'uracil-ADN-glycosylase (UDG) et son inhibiteur, l'Ugi.

L'anticorps et le fragment d'anticorps anti-Ugi selon la présente invention sont des antagonistes de l'Ugi possédant les propriétés suivantes :

- ils se lient spécifiquement à l'Ugi et possèdent une forte affinité pour l'Ugi, et

- ils sont capables d'inhiber la liaison entre l'UDG et l'Ugi.

Ces propriétés peuvent être vérifiées par des tests classiques permettant d'évaluer l'activité de liaison d'un anticorps à une protéine ou à un peptide ou l'inhibition de cette activité, notamment par des tests ELISA directs ou en compétition. Par exemple, le titre en ELISA des anticorps polyclonaux anti-Ugi, vis-à-vis de l'Ugi recombinante purifiée, est élevé (plus de 1/10⁶).

Conformément à l'invention, ledit anticorps est un anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal et ledit fragment d'anticorps est un Fab, un Fv ou un scFv.

L'anticorps ou le fragment d'anticorps selon l'invention sont préparés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, telles que celles décrites dans *Antibodies : A Laboratory Manual, E. Howell and D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988*.

De manière plus précise :

- l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase est produit dans *E.coli* à partir d'un vecteur d'expression approprié, puis il est purifié, comme décrit dans Wang et al. (*Genetics, 1991, 99, 31-37*), les fragments peptidiques de l'Ugi sont produits par les techniques classiques de synthèse peptidique ou d'expression d'ADN recombinant.

- les anticorps polyclonaux sont préparés par immunisation d'un animal approprié avec l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase ou l'un de ses fragments, éventuellement couplé à la KLH ou à l'albumine et/ou associé à un adjuvant approprié tel que l'adjuvant de Freund (complet ou incomplet) ou l'hydroxyde d'alumine ; après obtention d'un titre en anticorps satisfaisant, les anticorps sont récoltés par prélèvement du sérum des animaux immunisés et enrichis en IgG par précipitation, selon les techniques classiques, puis les IgG spécifiques de l'Ugi sont éventuellement purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne appropriée sur laquelle est fixée l'Ugi ou l'un de ses fragments, de façon à obtenir une préparation d'IgG monospécifiques.

- les anticorps monoclonaux sont produits à partir d'hybridomes obtenus par fusion de lymphocytes B d'un animal immunisé avec des myéloïmes, selon la technique de Köhler et Milstein (*Nature, 1975, 256, 495-497*) ; les hybridomes sont

cultivés *in vitro*, notamment dans des fermenteurs ou produits *in vivo*, sous forme d'ascite.

- les fragments d'anticorps sont produits à partir des régions V_H et V_L clonées, à partir des ARNm d'hybridomes ou de lymphocytes spléniques d'un animal immunisé ; par exemple, les fragments Fv, scFv ou Fab sont exprimés à la surface de phages filamenteux selon la technique de Winter et Milstein (Nature, 1991, 349, 293-299) ; après plusieurs étapes de sélection, les phages qui expriment les fragments d'anticorps spécifiques de l'antigène sont isolés et les ADNc correspondant auxdits fragments sont exprimés dans un système d'expression approprié, par les techniques classiques de clonage et d'expression d'ADN recombinant.

Les anticorps monoclonaux et polyclonaux ou leurs fragments tels que définis ci-dessus, sont purifiés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, notamment par chromatographie d'affinité.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit anticorps, il s'agit d'un anticorps polyclonal obtenu par immunisation d'un animal avec une préparation d'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase recombinant.

La présente invention a également pour objet, l'utilisation d'un anticorps anti-Ugi tel que défini ci-dessus, comme antagoniste de la liaison entre l'Ugi et l'UDG.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, lesdits anticorps sont utilisés pour décontaminer les réactions d'amplification d'acides nucléiques, notamment les réactions de polymérisation en chaîne (PCR).

La présente invention a en outre pour objet, un procédé d'amplification d'acides nucléiques décontaminés, comprenant les étapes suivantes :

a) incubation d'un mélange réactionnel contenant : un échantillon d'acides nucléiques à amplifier, les réactifs nécessaires à son amplification incluant des nucléotides désoxyuridinc triphosphate (dUTP), de l'uracile-ADN-glycosylase (UDG), de l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase (Ugi), et un anticorps anti-Ugi, à une température comprise entre 25°C et 60°C, de préférence à 37°C, pendant un temps suffisant pour permettre la déglycosylation des acides nucléiques contenant de la désoxyuridine, et

b) incubation dudit mélange à une température comprise entre 60°C et 98°C, de préférence entre 90°C et 98°C, pendant un temps suffisant pour permettre la dénaturation de l'anticorps anti-Ugi et la libération de l'Ugi, et

c) amplification de l'ADN dans des conditions appropriées.

5 Conformément à l'invention :

- ledit mélange réactionnel de l'étape a) comprend l'échantillon d'acides nucléiques à amplifier (ADN ou ADNc), des nucléotides dATP, dCTP, dGTP dUTP, des amores oligonucléotidiques, des ions Mg²⁺ et une polymérase à ADN, dans un tampon approprié,

10 - la durée de l'incubation à l'étape a) varie en fonction de la quantité d'ADN contaminant (ADN contenant de la désoxyuridine) à dégrader par l'uracil-ADN-glycosylase et peut être déterminée expérimentalement ; elle est généralement de moins d'une heure, de préférence de 30 s à 30 min, de manière préférée de 5 min à 10 min.

15 - la durée de l'incubation à l'étape b) est généralement de moins d'une heure, de préférence de 30s à 30 min, de manière préférée de 5 min à 10 min.

Le procédé selon l'invention qui comprend la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG (étape a) puis la libération de l'Ugi (étape b) à partir d'un mélange réactionnel de départ, permet de décontaminer l'ADN sans détruire l'ADN 20 nouvellement synthétisé et n'implique pas d'étape supplémentaire d'addition de l'Ugi, soit à la fin de l'étape de décontamination, soit à la fin de la réaction d'amplification.

De manière plus précise :

25 - à l'étape a), l'UDG active détruit les acides nucléiques contaminants contenant du dUTP alors que l'Ugi est inactivé sous forme de complexes reversibles, Ugi/anticorps anti-Ugi,

- à l'étape b), la chaleur inactive l'UDG, dissocie les complexes Ugi-anticorps et dénature les anticorps de façon irréversible, alors que l'Ugi est libéré,

- à l'étape c), l'Ugi se lie à l'UDG sous forme de complexes UDG-Ugi et inhibe l'activité de l'UDG au cours des étapes ultérieures d'amplification de 30 l'ADN.

Au sens de la présente invention, on entend par complexe Ugi-anticorps anti-Ugi réversible, un complexe stable en présence d'UDG mais qui est

dissocié par l'action de la chaleur qui dénature de façon irréversible les anticorps anti-Ugi.

La présente invention a en outre pour objet un kit de décontamination des réactions d'amplification d'acides nucléiques, caractérisé en ce qu'il comprend 5 au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la présente invention, de préférence sous la forme de complexes réversibles Ugi-anticorps ou Ugi-fragment d'anticorps.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à 10 des exemples de préparation des anticorps anti-Ugi objet de la présente invention, et de la mise en œuvre de ces anticorps pour la décontamination des réactions d'amplification d'acides nucléiques, ainsi que des dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre la mise au point de la concentration en UDG dans le mélange réactionnel ; un large excès d'ADN contaminant (100 ng) contenant du dUTP ou du dTTP (contrôle) est digéré pendant une heure à 37°C dans un mélange réactionnel contenant de l'UDG diluée au 1/25 ou au 1/50, correspondant aux concentrations finales de respectivement 0,04 U/µL et 0,02 U/µL. **A** : ADN dUTP. **B** : ADN dUTP + UDG 1/25. **C** : ADN dUTP + UDG 1/50. **D** : marqueur de poids moléculaire. **E** : ADN dTTP. **F** : ADN dTTP + UDG 1/25. **G** : ADN dTTP + UDG 1/50.

20 - la figure 2 illustre la mise au point de la durée de la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG ; un large excès d'ADN contaminant (100 ng) contenant du dUTP a été digéré pendant 30 min (A et B) ou une heure (D et E) à 37°C dans un mélange réactionnel sans UDG (B et E) ou contenant de l'UDG dilué au 1/25 (0,04 U/µL : A et D).

25 - la figure 3 illustre la mise au point de la concentration en Ugi permettant d'inhiber la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG ; un large excès d'ADN contaminant (100 ng) contenant du dUTP a été digéré pendant 60 min à 37°C, en présence d'UDG dilué au 1/25 ou au 1/50 et d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000 (C, D, E, G, H, I), ou bien pendant 90 min à 37°C, en présence d'UDG dilué au 1/50 et d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000 (K, L, M). **A** : ADN dUTP. **B**, **F** et **J** : marqueur de poids moléculaire. **C** : ADN dUTP + UDG 1/25. **G** et **K** : ADN dUTP + UDG 1/50. **D** : ADN dUTP + UDG 1/25 + Ugi 1/20000. **E** : ADN dUTP + UDG 1/25

+ Ugi 1/30000. **H et L** : ADN dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/20000. **I et M** : ADN dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/30000.

- la figure 4 illustre la mise au point de la concentration en sérum immun anti-Ugi (I.S.) permettant d'antagoniser l'effet inhibiteur de l'Ugi sur la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG ; le sérum pré-immun (P.I.) est utilisé comme contrôle. L'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) a été digéré pendant 90 min à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/50, d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, et de sérum immun anti-Ugi dilué au 1/100 ou de sérum pré-immun dilué au 1/100. **A** : marqueur de poids moléculaire. **B** : ADN-dUTP + UDG 1/50. **C** : ADN-dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/20000 + P.I. 1/100. **D** : ADN-dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/30000 + P.I. 1/100. **E** : ADN-dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/20000 + I.S. 1/100. **F** : ADN-dUTP + UDG 1/50 + Ugi 1/30000 + I.S. 1/100.

- la figure 5 illustre la mise au point des conditions de dénaturation des anticorps anti-Ugi ; deux séries identiques de l'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) sont mises en présence d'UDG diluée au 1/35, d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, et de sérum immun anti-Ugi dilué au 1/100 ou de sérum pré-immun dilué au 1/100. Préalablement à l'étape de digestion de 60 minutes à 37°C, l'une des deux séries est pré-incubée 10 min à 90°C (**J, K, L, M, N et O**). **A** : ADN-dUTP. **B** : ADN-dUTP + UDG 1/35. **C** : marqueur de poids moléculaire. **D et E** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000. **F et G** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000 + P.I. 1/100. **H et I** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000 + I.S. 1/100. **J et K** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000. **L et M** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000 + P.I. 1/100. **N et O** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000 + I.S. 1/100.

- la figure 6 illustre l'amplification PCR de l'ADN matriciel dans les conditions de décontamination établies à l'exemple 2 ; l'ADN contaminant (ADN-dUTP) est mélangé avec l'ADN plasmidique matriciel (ADN contenant du dTTP), l'UDG 1/35, en association ou non avec l'Ugi (1/20000 ou 1/30000) et avec le sérum immun anti-Ugi (I.S.) ou le sérum préimmun (P.I., contrôle), et amplifié dans les conditions telles que définies à l'exemple 2. **A** : marqueur de poids moléculaire. **B** : ADN-dUTP. **C** : ADN-dUTP + UDG 1/35. **D** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000. **E** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/20000 + P.I. 1/100. **F** : ADN-dUTP +

UDG 1/35 + Ugi 1/20000 + I.S. 1/100. **G** : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000.
H : ADN-dUTP + UDG 1/35 + Ugi 1/30000 + P.I. 1/100. **I** : ADN-dUTP + UDG 1/35
+ Ugi 1/30000 + P.I. 1/100. Panneau supérieur : incubation 60 minutes à 37°C.
Panneau inférieur : incubation 60 minutes à 37°C et amplification PCR dans les
5 conditions telles que définies à l'exemple 2.

EXEMPLE 1: Préparation et caractérisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre l'Ugi

1) Préparation d'Ugi recombinante (rUgi)

Des oligonucléotides chevauchant représentant la séquence codante complète de l'Ugi (Wang et Mosbaugh, J. Biol. Chem., 1989, 264, 1163-) ont été hybridés par leur séquence complémentaire, puis allongés et amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le produit d'amplification obtenu a été digéré par des enzymes de restriction appropriées, cloné dans le vecteur pUC18 (PHARMACIA) puis la conformité de la séquence insérée dans le plasmide recombinant a été vérifiée 10 par séquençage automatique. Un fragment du plasmide pUC18 recombinant correspondant à la séquence codant pour l'Ugi a ensuite été cloné dans le vecteur d'expression pQE80L (QIAGEN). La souche DH5 α d'*E. coli* a été transformée par le vecteur d'expression recombinant ainsi obtenu et la protéine Ugi recombinante produite par les bactéries transformées a été purifiée sur un support Ni-NTA agarose, 15 selon les recommandations du fabricant (QIAGEN). De manière plus précise, l'Ugi recombinante retenue sur le support NiNTA a été éluée en présence de 100 mM ou 200 mM d'imidazole puis l'imidazole présent a été éliminé par ultra-filtration.

L'analyse de la préparation de protéine obtenue par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes puis coloration au bleu de Coomassie, montre que le protocole employé permet de purifier la protéine Ugi avec une homogénéité très satisfaisante et un rendement moyen de 10 mg de protéine par litre de culture.

2) Préparation d'un sérum immun polyclonal anti-rUgi

2.1) Couplage de la rUgi à la KLH

La protéine Ugi recombinante purifiée (rUgi) préparée selon le protocole décrit au paragraphe précédent a été couplée à la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, PIERCE), à l'aide de glutaraldéhyde (SIGMA), en suivant le protocole

de couplage décrit dans Habeeb et Hiramoto et al.(Arch. Biochem. Biophys., 1998, 126, 6-). Alternativement, la protéine Ugi recombinante est celle disponible chez un fournisseur comme NEW ENGLAND BIOLABS (référence M0281). La rUgi couplée à la KLH a ensuite été purifiée et le rapport moléculaire rUgi/KLH a été calculé, selon le protocole décrit dans Briand et al., Immunol. Methods, 1985, 93, 9-). La préparation de rUGi est estimée à environ 500 molécules de rUgi par molécule de KLH.

2.2) Immunisation de lapins.

Des lapins ont été immunisés avec la rUgi couplée à la KLH préparée selon le protocole décrit au paragraphe précédent. Après une première injection intradermique multipoints de 0,15 mg par lapin, de protéine couplée, émulsionnée en adjuvant complet de Freund, les animaux ont reçu deux injections de rappel à trois semaines d'intervalle, de 0,025 mg de protéine couplée, émulsionnée en adjuvant incomplet de Freund.

Pour chaque lapin, un sérum pré-immun (P.I.) a été préparé avant la première immunisation et un immun-sérum (I.S.), une semaine après la dernière immunisation.

3) Analyse de la réactivité en ELISA d'un sérum polyclonal anti-Ugi

La réactivité des sérums a été analysée par test ELISA, vis à vis d'une préparation de protéine recombinante semblable à celle utilisée pour les immunisations.

La protéine Ugi recombinante diluée au 1/1000 dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4 est distribuée à raison de 100 µl (0,1 µg) dans les puits de plaques ELISA, puis les plaques sont incubées une nuit à température du laboratoire. Les plaques sont lavées avec du tampon PBS-Tween 20 (0,1 %), saturées avec du tampon PBS- Fraction V de la sérum albumine bovine (BSA : 1 %). Les sérums à tester (100 µl) préalablement dilués sont ajoutés, puis les plaques sont incubées 1 h à 37° C. Après 3 lavages, le conjugué anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase est ajouté à la dilution recommandée par le fabricant puis les plaques sont incubées 1 h à 37 °C. Après 4 lavages, le chromogène (ortho-phénylène-diamine, OPD) et le substrat (H₂O₂, 110 volumes) sont ajoutés et les plaques sont incubées 20 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite arrêtée par

addition d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 12,5 %) puis l'absorbance à 492 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique.

Les résultats des tests ELISA démontrent que la préparation de protéine Ugi recombinante est immunogène chez l'animal et que le titre des sérums immuns est élevé (plus de 1/10⁶).

EXEMPLE 2 : Mise au point des conditions de la décontamination en présence de complexes Ugi-anticorps anti-Ugi.

1) Matériel et méthode

a) amorces/matrice ADN

10 Les amorces CytTo5' (atggtaaggccgtcgccgtc, SEQ ID NO : 1) et CytTo3' (taaccctggaggccaataat, SEQ ID NO : 2) sont utilisées pour amplifier un fragment de 460 pb correspondant à l'ADNc codant pour la SOD cytosolique à cuivre-zinc de tomate (GENBANK X1040 et Perl-Treves, R. et al., Plant Mol. Biol., 1988, 11, 609-623), à partir d'un plasmide recombinant contenant ledit ADNc, utilisé 15 comme matrice pour la réaction d'amplification en chaîne (PCR).

b) réaction d'amplification (PCR)

Le mélange réactionnel contient dans un volume de 50 µl de tampon PCR : matrice ADN (25 ng), amorces (0,2 µM), MgCl₂ (1,5 mM), chacun des dNTP (200 µM) sous forme d'un mélange incluant du dTTP (contrôle) ou du dUTP, et 20 l'ADN polymérase (Taq, 2,5 UI).

L'amplification est réalisée dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 5 min est suivie de 30 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C pendant 40 sec, une étape d'hybridation à 58°C pendant 40 sec puis une étape d'elongation à 72°C pendant 50 sec, puis d'une étape finale 25 d'elongation à 72°C pendant 10 min. Les produits d'amplification obtenus sont conservés à + 4°C avant d'être analysés par électrophorèse en gel d'agarose (1,2% en tampon TAE), en présence de bromure d'éthidium.

c) autres réactifs

- ADN contaminant

30 L'ADN contaminant est constitué par un produit d'amplification comme ci-dessus, obtenu en présence de dUTP ; il est utilisé en large excès (100 ng), afin de pouvoir être visualisé sur un gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

L'ADN amplifié de façon similaire, mais en présence de dTTP au lieu de dUTP, est utilisé comme contrôle de la spécificité de la décontamination.

- UDG

L'UDG (LIFE TECHNOLOGIES ; 1 UI/ μ l) est utilisée aux dilutions 1/25, 1/35 et 1/50 correspondant respectivement aux concentrations finales suivantes : 0,04 U/ μ L, 0,028 U/ μ L et 0,02 U/ μ L.

- rUgi

La rUgi préparée comme décrit à l'exemple 1 (1,1 mg/ml), est utilisée aux dilutions 1/20000, 1/30000 correspondant respectivement aux concentrations finales suivantes : 55 ng/ml et 36 ng/ml

- anticorps

Le sérum immun anti-Ugi et le sérum préimmun servant de contrôle, préparés comme décrit à l'exemple 1, sont utilisés au 1/100.

2) Détermination de la concentration en UDG et de la durée de digestion de l'ADN contaminant par l'UDG

Après avoir vérifié que l'ADN de 460 pb était amplifié de façon similaire, en présence de dTTP ou de dUTP, les produits d'amplification ainsi obtenus dénommés (ADN-dTTP et ADN-dUTP ; 100 ng) ont été digérés pendant une heure à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/25 ou au 1/50 (figure 1), ou bien pendant 30 min ou une heure à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/25 (figure 2).

Les figures 1 et 2 montrent qu'un large excès d'ADN contaminant (100 ng), est digéré de façon complète et spécifique, par une incubation d'une heure à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/25 (0,04 U/ μ L).

3) Détermination de la concentration en Ugi permettant d'inhiber la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG

L'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) a été digéré pendant 60 min à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/25 ou au 1/50 et d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, ou bien pendant 90 min à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/50 et d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000 (figure 3).

La figure 3 montre qu'à la concentration la plus forte d'UDG, l'activité de l'UDG peut-être inhibée par l'Ugi au 1/20000 mais pas au 1/30000. En revanche, à la concentration la plus faible d'UDG, l'activité de l'UDG est inhibée

aussi bien par l'Ugi au 1/20000 qu'au 1/30000.

4) Détermination de la concentration en sérum immun anti-Ugi permettant d'antagoniser l'effet inhibiteur de l'Ugi sur la digestion de l'ADN contaminant par l'UDG

5

L'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) a été digéré pendant 90 min à 37°C, en présence d'UDG diluée au 1/50, d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, et de sérum immun anti-Ugi dilué au 1/100 ou de sérum pré-immun dilué au 1/100.

10 La figure 4 montre qu'aux deux concentrations d'Ugi testées, le sérum anti-Ugi est capable d'antagoniser l'effet inhibiteur de l'Ugi sur l'UDG, permettant ainsi à l'UDG de digérer complètement l'ADN contaminant.

5) Détermination des conditions de dénaturation des anticorps anti-Ugi

15 L'ADN de 460 pb amplifié en présence de dUTP (ADN-dUTP) est pré-incubé ou non pendant 10 minutes à 90°C, en présence d'UDG diluée au 1/35, d'Ugi dilué au 1/20000 ou au 1/30000, et de sérum immun anti-Ugi dilué au 1/100 ou de sérum pré-immun dilué au 1/100, puis les différents mélanges sont digérés pendant 60 min à 37°C.

La figure 5 montre que dans ces conditions que :

20 - l'ADN contaminant (ADN-dUTP) est bien digéré par l'UDG (piste B),

- les deux dilutions d'Ugi inhibent bien la digestion de l'ADN par l'UDG (pistes D et G) et que cette inhibition est antagonisée par le sérum immun anti-Ugi (pistes F et I),

25 - après un traitement de 10 minutes à 90°C, l'Ugi reste active car elle inhibe toujours l'UDG (pistes J et M) et protège donc l'ADN contaminant de la digestion par l'UDG,

- après ce même traitement l'anticorps a été dénaturé et il est alors incapable d'antagoniser l'effet inhibiteur de l'Ugi (pistes L et O),

30 - après ce même traitement, l'Ugi ainsi libéré devient alors capable d'inhiber l'UDG et empêche la dégradation de l'ADN-dUTP.

6) Amplification d'ADN décontaminés dans les conditions de décontamination ainsi déterminées.

L'ADN contaminant (ADN-dUTP) est mélangé avec l'ADN plasminique matriciel, l'UDG (1/35), en association ou non avec l'Ugi (1/20000 ou 1/30000) et le sérum immun anti-Ugi (I.S., 1/100) ou le sérum préimmun (P.I., contrôle, 1/100) et amplifié dans les conditions telles que définies au paragraphe 1.

5 La figure 6 montre que :

- après une incubation de 60 minutes à 37°C, l'UDG au 1/35 digère bien l'ADN dUTP mais pas l'ADN matriciel qui contient du dTTP (piste C),

- les deux dilutions d'Ugi inhibent bien l'UDG (pistes D et G) et le sérum pré-immun n'a pas d'effet sur cette inhibition (pistes E et H),

10 - l'anticorps anti-Ugi antagonise l'effet inhibiteur de l'Ugi sur l'UDG, permettant ainsi à l'UDG de digérer complètement l'ADN contaminant (pistes F et I),

- les différents constituants du mélange réactionnel qui permettent de dégrader l'ADN contaminant à partir d'un mélange réactionnel unique, n'interfèrent,

15 ni avec l'amplification de l'ADN matriciel après 30 cycles d'amplification, ni avec l'intégrité du produit d'amplification obtenu (pas de dégradation de l'ADN-dUTP néo-synthétisé).

REVENDICATIONS

- 1°) Anticorps ou fragment fonctionnel d'anticorps comprenant au moins les domaines variables des chaînes lourdes et légères, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase de séquence 5 GENBANK P14739 et en ce qu'il inhibe la liaison entre l'uracile-ADN-glycosylase et ledit inhibiteur.
- 2°) Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les anticorps monoclonaux, les anticorps polyclonaux et les fragments Fab, Fv et scFv.
- 10 3°) Anticorps selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps polyclonal obtenu par immunisation d'un animal avec une préparation d'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase recombinant.
- 15 4°) Utilisation d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comme antagoniste de la liaison entre l'uracile-ADN-glycosylase et son inhibiteur.
- 5°) Utilisation selon la revendication 4, pour décontaminer les réactions d'amplification d'acides nucléiques, notamment les réactions de polymérisation en chaîne.
- 20 6°) Procédé d'amplification d'acides nucléiques décontaminés, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:
- a) incubation d'un mélange réactionnel contenant : un échantillon d'acides nucléiques à amplifier, les réactifs nécessaires à son amplification incluant des nucléotides désoxyuridine triphosphate, de l'uracile-ADN-glycosylase, de l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase, et un anticorps ou un fragment d'anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, à une température comprise entre 25°C et 60°C, de préférence à 37°C, pendant un temps suffisant pour permettre la déglycosylation des acides nucléiques contenant de la désoxyuridine, et
- 25 b) incubation dudit mélange à une température comprise entre 60°C et 98°C, de préférence entre 90°C et 98°C, pendant un temps suffisant pour permettre la dénaturation des anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase et la libération de l'Ugi, et

REVENDICATIONS

1°) Anticorps ou fragment fonctionnel d'anticorps comprenant au moins les domaines variables des chaînes lourdes et légères, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase de séquence SWISS-
5 PROT P14739 et en ce qu'il inhibe la liaison entre l'uracile-ADN-glycosylase et ledit inhibiteur.

2°) Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les anticorps monoclonaux, les anticorps polyclonaux et les fragments Fab, Fv et scFv.

10 3°) Anticorps selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps polyclonal obtenu par immunisation d'un animal avec une préparation d'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase recombinant.

15 4°) Utilisation d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comme antagoniste de la liaison entre l'uracile-ADN-glycosylase et son inhibiteur.

5°) Utilisation selon la revendication 4, pour décontaminer les réactions d'amplification d'acides nucléiques, notamment les réactions de polymérisation en chaîne.

20 6°) Procédé d'amplification d'acides nucléiques décontaminés, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) incubation d'un mélange réactionnel contenant : un échantillon d'acides nucléiques à amplifier, les réactifs nécessaires à son amplification incluant des nucléotides désoxyuridine triphosphate, de l'uracile-ADN-glycosylase, de l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase, et un anticorps ou un fragment d'anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, à une température comprise entre 25°C et 60°C, de préférence à 37°C, pendant un temps suffisant pour permettre la déglycosylation des acides nucléiques contenant de la désoxyuridine, et

30 b) incubation dudit mélange à une température comprise entre 60°C et 98°C, de préférence entre 90°C et 98°C, pendant un temps suffisant pour permettre la dénaturation des anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase et la libération de l'Ugi, et

c) amplification de l'ADN dans des conditions appropriées.

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'incubation aux étapes a) et b) est réalisée pendant moins d'une heure, de préférence pendant 30 s à 30 min, de manière préférée pendant 5 min à 10 min.

5 8°) Procédé selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase et l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase forment un complexe réversible.

10 9°) Kit de décontamination des réactions d'amplification d'acides nucléiques, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 1 ou la revendication 2, de préférence sous la forme de complexe réversible avec l'inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase.

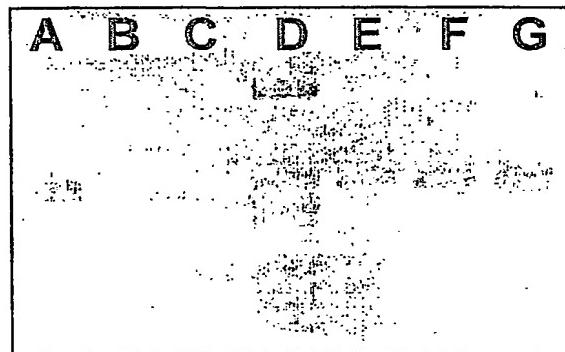


Figure 1

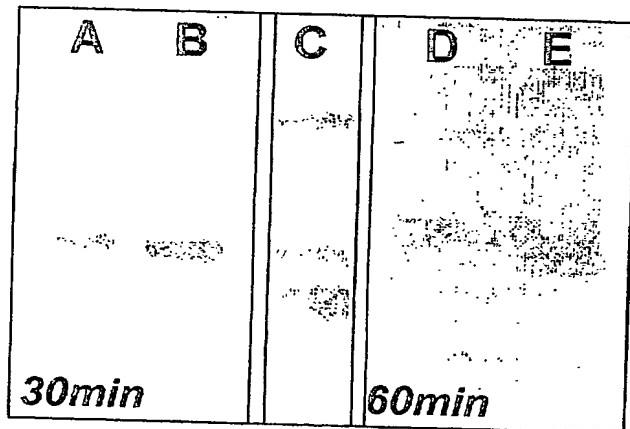


Figure 2

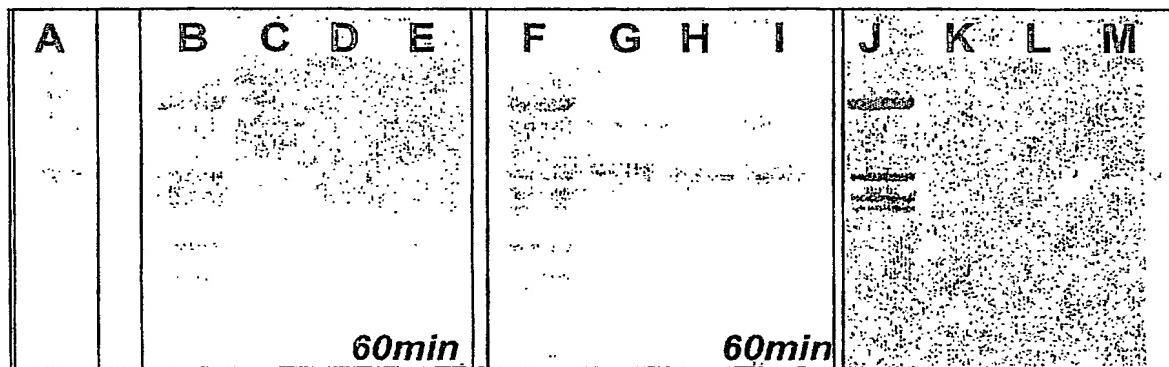


Figure 3

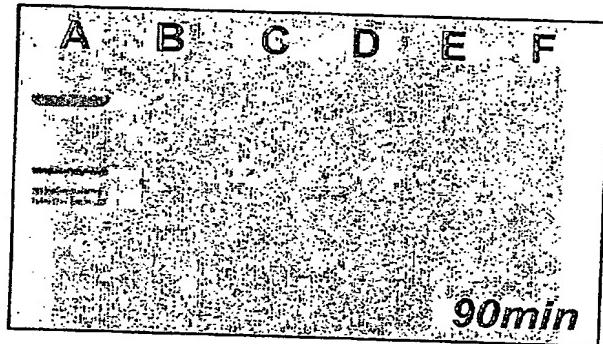


Figure 4

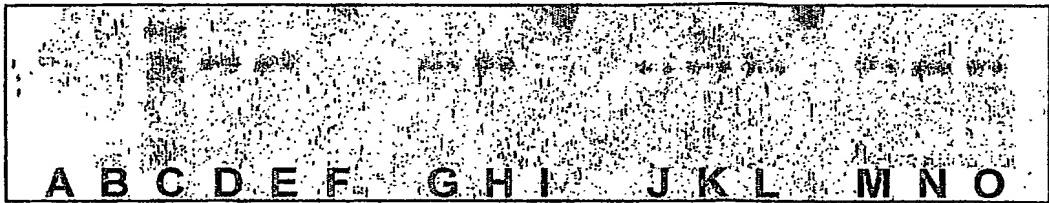


Figure 5

6/6

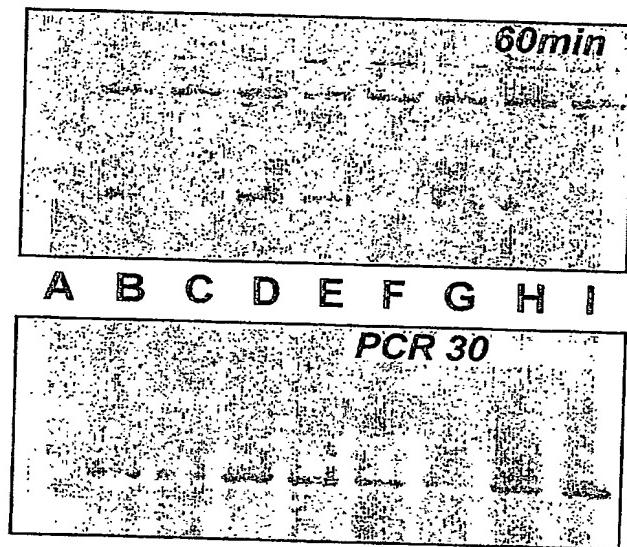


Figure 6

s1422FR1
SEQUENCE LISTING

<110> KABERTEK

<120> Anticorps anti-inhibiteur de l'uracile-ADN-glycosylase et leurs applications pour la décontamination des réactions d'amplification des acides nucléiques

<130> s1422FR1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 1

atgggtgaagg ccgtcgccgt c

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 2

ttaaccctgg aggccaataaa t

21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.